

**PENGARUH TERAPI PREVENTIF MADU HUTAN SUMBAWA
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA)
DAN HISTOPATOLOGI JEJUNUM TIKUS
(*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
PLUMBUM (Pb)**

SKRIPSI

Oleh:

ARNES MARDASELLA

135130107111027



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH TERAPI PREVENTIF MADU HUTAN SUMBAWA
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA)
DAN HISTOPATOLOGI JEJUNUM TIKUS
(*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
PLUMBUM (Pb)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

ARNES MARDASELLA

135130107111027



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa
Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan
Histopatologi Jejunum Tikus (*Rattus
norvegicus*) yang Diinduksi
Plumbum (Pb)**

Oleh :
ARNES MARDASELLA
135130107111027

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 28 Desember 2017
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 19520412 198002 1 001

drh. Analis Wisnu W., M. Biomed
NIP. 19800904 200812 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Arnes Mardasella

NIM : 135130107111027

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi Berjudul:

Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Histopatologi Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Plumbum (Pb)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dan skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala risiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 28 Desember 2017

Yang menyatakan,

(Arnes Mardasella)

NIM. 135130107111027

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



PERSONAL DETAIL

Name	Arnes Mardasella
Place of birth	Sidoarjo
Date of birth	May, 23 ^h 1995
Gender	Female
Religion	Islam
Marital Status	Single
Address 1	Jl. Senawi II No. 101 A Keboan-Anom RT 03/RW 01 Gedangan Sidoarjo 61254
Address 2	Jl. Mayjend Panjaitan No.80 Malang 65113
Phone (mobile)	082231113175
Email- Address	arnes.mardasella@gmail.com
Nationality	Indonesian



FORMAL EDUCATION

Level	Place	Period
Kinder garten	Taman Kanak-Kanak (TK) Keboan-Anom, Gedangan Sidoarjo	2000-2002
Elementary School	SDN 1 Keboan-Anom, Gedangan Sidoarjo	2002-2008
Junior High School	SMP N 2 Gedangan Sidoarjo	2008-2011
Senior High School	SMA N 1 Taman Sidoarjo	2011-2013
College	Fakultas Kedokteran Hewan UB, Malang	2013-2018

Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Histopatologi Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Plumbum (Pb)

ABSTRAK

Pencemaran plumbum (Pb) dapat menjadi sumber radikal bebas yang dapat menyebabkan terganggunya metabolisme tubuh. Tubuh membutuhkan antioksidan untuk melawan radikal bebas tersebut. Madu hutan sumbawa mengandung antioksidan berupa senyawa flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi preventif madu hutan sumbawa terhadap kadar Malondialdehida (MDA) dan histopatologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum (Pb). Penelitian ini dibagi 5 kelompok perlakuan, yaitu kontrol negatif, kontrol positif dengan pemberian Pb 10 mg/ekor/hari selama 14 hari, dan kelompok terapi preventif dengan madu hutan sumbawa 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB dan 75 mg/kg BB selama 28 hari dan pemberian plumbum (Pb) dosis 10 mg/ekor/hari selama 14 hari. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 tikus. Kadar MDA jejunum dianalisa dengan metode spektrofotometri dan histologi jejunum menggunakan pewarnaan HE yang diamati menggunakan mikroskop cahaya. Analisa data dilakukan secara kuantitatif dengan *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dilanjutkan uji *Tukey* ($\alpha=5\%$) untuk kadar MDA dan analisa secara kualitatif untuk gambaran histopatologi jejunum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi madu hutan sumbawa dosis 50 mg/kg BB dan 75 mg/kg BB berpengaruh sangat signifikan ($P<0,01$) menurunkan kadar malondialdehida (MDA). Dosis pemberian 75 mg/kgBB merupakan dosis terbaik yang mampu menurunkan kadar MDA dari kontrol positif dan dapat memperbaiki gambaran histopatologi jejunum. Kesimpulan dari penelitian ini adalah madu hutan sumbawa dapat dijadikan terapi untuk menurunkan radikal bebas karena induksi plumbum (Pb).

Kata kunci: Jejunum, Madu hutan Sumbawa, MDA, Plumbum (Pb)

The Preventive Therapy of Sumbawa Forest Honey on Malondialdehyde (MDA) and Jejunal Histopathology on Rats Induced by Plumbum (Pb)

ABSTRACT

Pollution of plumbum (Pb) can be a source of free radicals that can cause disruption of the body's metabolism. The body needs antioxidant to prevent free radicals. Sumbawa forest honey contains the antioxidants such as flavonoid. The purpose of this research was to determine the preventive therapy of sumbawa forest honey on Malondialdehyde (MDA) and jejunal histopathology on white rat (*Rattus norvegicus*) induced by Plumbum (Pb). Research was conducted in 5 different groups, namely negative control group, positive control group that induced by Plumbum (Pb), and preventive therapy groups with sumbawa forest honey dose of 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB and 75 mg/kg BB for 28 days and administered with lead ion dose of 10 mg/day for 14 days. Each treatment group contents of 4 rats. MDA jejunal levels were analyzed by spectrophotometric method and histopathology jejunal using HE staining was observed using a light microscope. Data analysis was done quantitatively with One Way Analision Variance (ANOVA) continued Tukey test with $\alpha = 5\%$ for MDA content and qualitative analysis for jejunal histopathology. The results showed that sumbawa forest honey therapy doses 50 mg/kg BB and 75 mg/kg BB have a very significantly effect ($P < 0,01$) decreased the malondialdehyde (MDA) level. The dose of 75 mg/kgBB was the best dose that could decrease MDA level from positive control and could repair jejunal histopathology improvement. Here is a sumbawa forest honey that can be used as therapy for plumbum (Pb) induction.

Key words: Jejunal, MDA, Plumbum (Pb), Sumbawa forest honey

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga Skripsi yang berjudul : Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Histopatologi Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Plumbum (Pb) telah selesai dilaksanakan. Sholawat serta salam semoga tetap dicurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Naskah skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS selaku dosen pembimbing pertama atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan.
2. drh. Analis Wisnu Wardhana, M. Biomed sebagai dosen pembimbing kedua atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
3. Dhita Evi Aryani, S.Farm, Apt. selaku dosen penguji yang membantu dalam proses penelitian penulis hingga selesai.
4. drh. Mira Fatmawati, M. Si. selaku dosen penguji atas kritik dan saran yang diberikan kepada penulis.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.

6. Orangtua tercinta Drs. Sardi dan Armani, serta kakak tercinta Widya Ardyanita yang sangat istimewa dalam memberikan dukungan, bantuan, semangat, doa dan motivasi yang diberikan kepada penulis.
7. Seluruh teman CAVITAS dan Kopi Everywhere serta teman-teman kelompok penelitian Cindy Oktati Kasari, Olenka Putri Windiarko, Diana Anggraeni dan Putri Stefy Graf yang senantiasa memberikan saran, kritik, motivasi semangat, inspirasi, bantuan, kebersamaan, keceriaan dan semua hal yang sangat luar biasa.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak sempat disebutkan.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Skripsi ini dapat memberikan manfaat dan wawasan tidak hanya bagi penulis namun juga bagi pembaca.

Malang, 28 Desember 2017

(Arnes Mardasella)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Batasan Masalah	4
1.4. Tujuan Penelitian	5
1.5. Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Madu Hutan Sumbawa	6
2.2. Cemaran Plumbum (Pb) dan Bahayanya	10
2.3. Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	12
2.4. Malondialdehida (MDA)	13
2.5. Gambaran Histopatologi Jejunum	15
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1. Kerangka Konseptual	19
3.2. Hipotesa Penelitian	22
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	23
4.2. Alat dan Bahan Penelitian	23
4.2.1. Alat Penelitian	23
4.2.2. Bahan Penelitian	23
4.3. Tahapan Penelitian	24
4.3.1. Rancangan Penelitian	24
4.3.2. Penetapan Sampel Penelitian	25
4.3.3. Variabel Penelitian	25
4.4. Karakteristik Sampel Penelitian	26
4.4.1. Karakteristik Inklusi	26
4.4.2. Karakteristik Eksekusi	26
4.5. Prosedur Kerja	26
4.5.1. Persiapan Hewan Coba	26
4.5.2. Penentuan Dosis Madu	27

4.5.3. Pemberian Plumbum	27
4.5.4. Pengambilan Organ Jejunum Tikus	28
4.5.5. Pengukuran kadar <i>Malondialdehida</i> (MDA)	28
4.5.6. Histopatologi Jejunum	30
4.5.6.1. Pembuatan Preparat dan Pewarnaan <i>Hematoxyline</i> <i>Eosin</i> (HE) Histopatologi Jejunum	30
4.5.6.2. Pengamatan Histopatologi	32
4.6. Analisa Data	32
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1. Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa yang Diinduksi Plumbum (Pb) Terhadap Kadar <i>Malondialdehida</i> (MDA)	33
5.2. Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa yang Diinduksi Plumbum (Pb) Terhadap Histopatologi Jejunum Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	38
BAB 6 PENUTUP	
6.1. Kesimpulan	44
6.2. Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	51



DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
4.1	Rancangan Kelompok Penelitian.....	24
5.1	Kadar rata-rata <i>Malondialdehida</i> (MDA).....	33
5.2	Perbedaan Histopatologi Jejunum.....	39
8.1	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	64
8.2	Hasil Pengukuran Absorbansi Kurva Standar MDA dengan panjang gelombang maksimum 530 nm.....	64
8.3	Data Absorbansi MDA.....	65
9.1	Kadar MDA dan Penurunan Kadar MDA.....	66



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	12
2.2 Mekanisme Pembentukan MDA.....	15
2.3 Gambaran Histopatologi Jejunum.....	17
5.1 Histopatologi Organ Jejunum Tikus (Pewarnaan HE 100x dan 400x)..	38



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pencemaran logam berat merupakan salah satu permasalahan yang telah lama tersebar di masyarakat luas. Pencemaran logam berat sangat berbahaya bagi lingkungan terutama oleh logam berat pada kawasan perairan, baik akibat penggunaan air untuk konsumsi sehari-hari ataupun ketika mengonsumsi biota air tawar yang hidup di perairan tercemar tersebut. Salah satu logam berat yang bersifat racun dan sering mencemari lingkungan adalah timbal/plumbum (Pb) (Nugroho, 2006).

Proses pencemaran Pb pada makanan terjadi pada hasil olahan makanan dalam kaleng. Kontaminasi ini berasal dari kaleng karena proses pematiran pada saat penyambungan antara bagian badan kaleng dan dari campuran cat yang digunakan untuk melindungi bahan kaleng. Kadar Pb dalam kemasan kaleng adalah $637,64 \pm 94,25$ ppm dan kadar Pb yang bermigrasi ke dalam makanan/minuman sebesar $0,171 \pm 0,02$ ppm (Mostafa *et al.*, 2010).

Pencemaran melalui air minum juga dapat tercemar cukup tinggi oleh karena pipa air yang digunakan adalah berlapis Pb. Plumbum pada pipa yang beredar berfungsi sebagai bahan antikorosi. Tidak banyak yang peduli terhadap produk pipa untuk instalasi air, tetapi Pb berbahaya bagi kesehatan jangka panjang karena dapat memicu terjadinya berbagai penyakit. Kandungan Pb dalam air sebesar 15 mg/l dianggap sebagai konsentrasi yang aman untuk dikonsumsi. Keberadaan Pb dalam tubuh dapat berpengaruh dan mengakibatkan berbagai gangguan fungsi jaringan dan metabolisme. Konsumsi produk makanan dan

minuman yang tercemar Pb juga akan berdampak negatif pada hewan dan *pet animal* (Jain *et al.*, 2005).

Menurut Hariono (2005), melaporkan bahwa absorpsi Pb anorganik melalui saluran pencernaan pada tikus sekitar 16% dan diekskresikan melalui ginjal sekitar 0,006%. Di Indonesia, data penderita keracunan Pb pada hewan dan manusia belum dilaporkan secara rinci, namun banyak kemungkinan adanya kasus keracunan Pb pada hewan, manusia dan tanaman tercemar.

Paparan Pb yang masuk ke dalam tubuh menyebabkan terbentuknya radikal bebas dalam tubuh yang akan menghambat aktivitas antioksidan endogen seperti kadar *Malondialdehida* (MDA). Keberadaan Pb dalam jaringan dan cairan tubuh dapat berpengaruh dan mengakibatkan berbagai gangguan fungsi jaringan dan metabolisme. Hal ini disebabkan karena ekskresi Pb cenderung lambat dan menetap dalam tubuh sehingga pada akhirnya akan menumpuk dalam jaringan tubuh sampai mencapai tingkat yang bersifat racun dan menyebabkan kerusakan pada organ-organ tertentu. Logam Pb diekskresikan jauh lebih lambat dibandingkan absorpsinya dan sebagai akibatnya akan tertimbun dalam jaringan lunak seperti hepar, limpa, otak, dan tulang. Plumbum yang tinggi dalam tubuh juga akan mempengaruhi sistem pencernaan, sistem hemopoetik, sistem syaraf dan ginjal (Fenga *et al.*, 2006).

Plumbum yang masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan akan dicerna bersama makanan dan diabsorpsi dalam usus halus sekitar 5%–10% dari jumlah yang ditelan. Usus halus merupakan tempat digesti terakhir dan tempat absorpsi zat makanan. Jika terdapat benda asing yang bersifat toksik maka akan

terdapat akumulasi zat toksik tersebut dan mengganggu sistem penyerapan sari-sari makanan yang terjadi di dalam usus halus terutama pada jejunum. Setelah diabsorpsi, kemudian masuk ke dalam sirkulasi darah dan didistribusikan ke berbagai organ dalam tubuh terutama pada tulang. Plumbum yang melalui hati dan ginjal dapat diekskresikan melalui feses dan urin (Hariono, 2005).

Jumlah radikal bebas yang tinggi dalam tubuh juga harus diimbangi dengan adanya antioksidan yang berasal dari luar tubuh (antioksidan eksogen). Antioksidan diperlukan untuk menetralkan radikal bebas. Salah satu yang mengandung senyawa antioksidan adalah madu hutan. Madu hutan memiliki kandungan flavonoid yang cukup tinggi sehingga dapat menjadi antioksidan karena dapat menangkap radikal bebas dengan membebaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya (Suranto, 2007).

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dilakukan untuk mempelajari pengaruh terapi preventif madu hutan sumbawa terhadap kadar *Malondialdehida* (MDA) dan mengetahui gambaran histopatologi jejunum pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan plumbum (Pb).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah madu hutan sumbawa dapat menurunkan kadar *Malondialdehida* (MDA) pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum (Pb) ?
2. Apakah madu hutan sumbawa dapat mempertahankan struktur jaringan pada jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum (Pb) ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih strain wistar sejumlah 20 ekor, berumur 8–10 minggu, berat badan rata-rata 200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini sudah memperoleh sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian (KEP) Universitas Brawijaya dengan No. 790-KEP-UB pada **Lampiran 1**.
2. Madu hutan sumbawa yang digunakan diperoleh dari sumbawa yang diberikan selama 28 hari berturut–turut dengan dosis 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 75 mg/kg BB untuk masing–masing tikus putih pada setiap perlakuan (Al – Yahya, 2013).
3. Plumbum yang digunakan diperoleh dari Panadia kota Malang. Pemberian plumbum (Pb) diberikan sebanyak 10 mg/ekor/hari. Plumbum diberikan dalam bentuk serbuk (Pb asetat) yang dilarutkan dengan aquades dan diberikan selama 14 hari yang dimulai pada hari ke 15–28 (Suprijono dkk., 2011).
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar *Malondialdehida* (MDA) dan pengamatan histopatologi jejunum diamati secara kualitatif menggunakan pewarnaan HE dan mikroskop *Olympus BX51*.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh terapi preventif madu hutan sumbawa terhadap kadar *Malondialdehida* (MDA) tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum (Pb).
2. Mengetahui pengaruh terapi preventif madu hutan sumbawa terhadap histopatologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum (Pb).

1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang pemanfaatan madu hutan sumbawa sebagai terapi preventif terhadap kerusakan jejunum atau gangguan organ lain sebagai akibat induksi plumbum(Pb).



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Madu Hutan Sumbawa

Madu merupakan produk alami yang dihasilkan oleh lebah madu, terdiri dari campuran kompleks dari gula, dimana fruktosa dan glukosa adalah bahan utama. Madu merupakan makanan fungsional karena memiliki sifat biologis yang beragam. Madu memiliki kandungan bermacam vitamin, asam organik, fenolik, mineral dan enzim yang berguna bagi tubuh. Semua kandungan tersebut dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan tradisional, antibakteri (sifat bakteriostatik), antiinflamasi, penyembuhan luka dan kulit terbakar, antioksidan, antidiabetes, memperkuat kekebalan tubuh serta penghambat pertumbuhan sel kanker. Oleh karena itulah madu sering digunakan sebagai pengobatan alternatif (Aljadi dan Kamaruddin, 2004).

Madu merupakan zat cair yang rasanya manis berasal dari nektar bunga atau cairan lain dari bagian tanaman yang dikumpulkan lebah, diubah dan diikat dengan senyawa-senyawa tertentu dalam perut lebah yang kemudian disiapkan dalam sarangnya sebagai makanan cadangan. Madu merupakan larutan gula yang jenuh, yang sebagian besar terdiri dari fruktosa (38,5%) dan glukosa (31%). Selain karbohidrat, madu juga mengandung protein, asam amino, enzim, vitamin, dan mineral serta kaya akan kandungan antioksidan seperti vitamin C, flavonoid dan alkaloid. Setiap jenis madu dari sumber nektar yang berbeda memiliki manfaat dan khasiat yang berbeda pula. Walaupun demikian secara umum khasiat dan manfaat madu tersebut hampir sama. Terdapat 4 faktor yang mendukung madu sebagai prebiotik atau antibakteri yakni kadar gula madu yang tinggi mampu menghambat

pertumbuhan dan perkembangan bakteri, madu bersifat asam dengan pH sekitar 3-4 sehingga bakteri tidak mampu bertahan, madu mengandung senyawa organik yang bersifat antibakteri antara lain inhibine dari kelompok flavonoid, glikosida dan polyphenol, dan madu mengandung senyawa radikal hidrogen peroksida (H_2O_2) yang dapat membunuh bakteri dan mikroorganisme patogen lainnya. Senyawa tersebut secara reaktif merusak gugus fungsi biomolekul pada sel bakteri. Enzim katalase yang terkandung pada madu akan segera merombak hidrogen peroksida (H_2O_2) yang telah digunakan untuk meracuni bakteri menjadi air dan oksigen (Zulhawa, 2010).

Sumbawa merupakan salah satu daerah penghasil madu terbaik di Indonesia. Terkenalnya khasiat madu sumbawa disebabkan sumber madu tersebut berasal dari lebah liar yang hanya bisa di temukan di hutan. Lebah-lebah madu di Sumbawa tidak ditenakkan melainkan langsung diambil dari hutan-hutan yang ada di Sumbawa. Makanan lebah yang alami membuat madu sumbawa berbeda dengan madu daerah lain. Sumbawa terkenal dengan pohon bidara atau dalam bahasa lokalnya *boan* dan dalam bahasa latinnya disebut *Ziziphus mauritiana*. Faktor geografis Sumbawa yang kering dan panas membuat kandungan air yang ada dalam madu sumbawa menjadi lebih rendah dibandingkan madu daerah lainnya (Zulhawa, 2010).

Madu sering diberi nama sesuai dengan lokasi geografis dimana madu diproduksi, sumber bunga madu atau pohon-pohon dimana sarang ditemukan. Nama sumbawa identik dengan madu hutan, cairan penjaga kesehatan yang berkhasiat tinggi ini dihasilkan dari belantara rimba. Madu hutan sumbawa yaitu

madu yang berasal dari sejenis pohon lokal yang dalam bahasa setempat dikenal dengan sebutan *boan*, tempat bersarangnya *Apis dorsata* yang menyediakan nektar bagi lebah hutan. Pohon *boan* tersebar di lereng pengunungan dan di lokasi tertentu ditemukan di lembah, sepanjang sungai dan sungai anak atau riparian. Pohon *boan* membentuk lanskap hutan yang menutupi kawasan lindung Kabupaten Sumbawa seluar 45%. Keberadaan lanskap hutan diperlukan untuk menjamin kelangsungan usaha madu hutan bagi penduduk setempat (Maryani dkk., 2013). Madu hutan sumbawa berasal dari hutan lindung dikategorikan mengikuti topologi tertentu, kelompok hutan ini merupakan penghasil utama madu hutan. Usaha madu hutan yang dikelola melalui suatu jaringan pemasaran melibatkan 265 kepala keluarga yang tersebar di sembilan desa wilayah Kabupaten Sumbawa (Jurmansyah, 2010).

Beberapa tahun terakhir, terjadi peningkatan minat dalam menentukan potensi antioksidan dari madu. Beretta *et al.*, (2005) menyatakan bahwa sumber botani madu memiliki pengaruh terbesar pada aktivitas antioksidannya, sedangkan pengolahan penanganan dan penyimpanan dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan madu hanya untuk sebagian kecil. Hal ini ditunjukkan dalam beberapa penelitian bahwa potensi antioksidan dari madu berkorelasi dengan konsentrasi total fenolik.

Tidak hanya kandungan fenolik saja yang berperan dalam aktifitas antioksidan, madu juga mengandung banyak senyawa yang dapat bertindak sebagai antioksidan seperti asam organik, vitamin, katalase, dan glutathion peroksidase (Aljadi dan Kamaruddin, 2004; Batrusaitylè *et al.*, 2007). Penelitian lain menyebutkan bahwa aktivitas antioksidan juga berkorelasi dengan warna madu,

madu berwarna gelap memiliki kandungan total fenol yang lebih tinggi sehingga kapasitas antioksidan lebih tinggi (Beretta *et al.*, 2005). Ada lebih dari 150 senyawa fenolik dalam madu, termasuk asam fenolik, flavonoid, flavonol, catechin dan turunan asam sinamat. Komposisi dan kuantitas komponen ini bervariasi sesuai dengan asal bunga dan kondisi geografis (Ferreira *et al.*, 2009).

Madu merupakan pemanis alternatif yang paling aman, yang telah dibuktikan oleh beberapa penelitian dapat menurunkan kadar glukosa darah. Madu mengandung vitamin A, C, E, asam organik, fenol dan flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan serta penangkap radikal bebas (Astarika, 2011). Penelitian lain menyatakan selain senyawa-senyawa tersebut, beta karoten merupakan salah satu senyawa yang berperan sebagai antioksidan yang terkandung dalam madu dan mampu meredam radikal bebas (Parwata *et al.*, 2010). Zat-zat antioksidan fenolik yang terdapat dalam madu lebih efektif dan dapat menambah perlawanan tubuh terhadap stres oksidatif (Al-'Id, 2010). Pemberian madu diharapkan dapat meningkatkan kadar antioksidan, dan mengakibatkan menurunnya kadar radikal bebas dalam tubuh. Bukti bahwa produk radikal bebas meningkat, salah satunya ditunjukkan oleh kadar *Malondialdehid* (MDA) yang tinggi (Winarsi, 2010). Peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) ini juga mengakibatkan terjadinya peningkatan MDA akibat proses peroksidasi lipid, sehingga MDA digunakan sebagai salah satu marker untuk mengetahui stress oksidatif dalam sel (Shofia *et al.*, 2013).

Reactive Oxygen Species (ROS) adalah produk samping reaksi fosforilasi oksidatif mitokondria. Pembentukan ROS terjadi saat satu elektron dari molekul O₂

mengalami reduksi yang menghasilkan superoksida ($O_2^{\cdot-}$) yang selanjutnya diubah menjadi H_2O_2 dengan bantuan enzim superoksida dismutase. ROS dapat merusak unsur-unsur didalam mitokondria, seperti fosfolipid, protein, dan DNA. Akumulasi ROS yang semakin meningkat di dalam sel akan membentuk ikatan dengan asam lemak tak jenuh rantai panjang *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang memiliki ikatan rangkap dan kemudian menghasilkan radikal lipid peroksida dan produk aldehida (Patrick, 2006).

1.2 Cemarkan Plumbum (Pb) dan Bahayanya

Timbal atau plumbum (Pb) merupakan salah satu unsur logam berat golongan IVA yang memiliki warna putih kebiruan yang terlihat ketika logam Pb dipotong dan warna ini akan segera berubah menjadi abu-abu gelap ketika terkena udara. Plumbum bersifat lunak dan lentur, tetapi akan rapuh dan mengkerut ketika berada dalam keadaan dingin. Unsur yang mempunyai nomor atom 82, nomor massa 207,2, titik leleh 327 °C dan titik didih 1.620 °C ini, mempunyai sifat sukar larut dalam asam nitrit, asam asetat dan asam sulfat pekat (Palar, 2004).

Pajanan Pb dapat berasal dari makanan, minuman, udara, dan lingkungan kerja yang tercemar Pb. Plumbum dan senyawanya masuk ke dalam tubuh manusia melalui saluran pernafasan dan saluran pencernaan, tetapi absorpsi melalui kulit sangat kecil. Bahaya yang ditimbulkan oleh Pb tergantung oleh ukuran partikelnya (Ardyanto, 2005).

Plumbum yang masuk melalui saluran pernapasan akan diabsorpsi melalui paru-paru sekitar 10-30% dan sekitar 5-10% dari yang tertelan akan diabsorpsi

melalui saluran cerna. Sebanyak 30-40% Pb yang diabsorbsi melalui saluran pernapasan akan masuk ke aliran darah (Palar, 2004).

Tikus mempunyai ambang toksik Pb yang didapat secara oral yakni 790 mg/kg dengan pemaparan kurang dari 14 hari, sedangkan pemaparan Pb lebih dari 14 hari memiliki ambang dosis toksik 1100 mg/kg. Ambang dosis toksik Pb yang didapat secara inhalasi adalah 10 mg/m³/24 jam, sedangkan ambang dosis toksik yang didapat secara intraperitoneal adalah 1000 mg/kg (Napitupulu, 2008).

Kandungan Pb maksimal yang boleh terbawa dalam bahan makanan yang disyaratkan oleh FAO/WHO dan Ditjen Pengawasan Obat dan Makanan adalah 2 ppm. Logam berat Pb dapat ditoleransi dalam seminggu dengan jumlah 50 mg/kg berat badan untuk dewasa dan 25 mg/kg berat badan untuk anak-anak. Kandungan Pb dalam air sebesar 15 mg/l dianggap sebagai konsentrasi yang aman untuk dikonsumsi. Kadar normal Pb dalam darah adalah 0,003 mg/100 cc. Jika kadar Pb lebih dari 0,10 mg/ 100 cc darah, maka dapat menyebabkan keracunan (Chiroma *et al.*, 2007).

Kasus keracunan Pb pada hewan ternak umumnya dilaporkan akibat memakan rumput yang berasal dari sekitar daerah pertambangan atau industri, rumput yang berasal dari sekitar jalan raya atau hewan mengunyah serpihan-serpihan cat tembok, menjilat-jilat kaleng cat, oli motor dan batu baterai bekas. Hewan-hewan tersebut memperlihatkan gejala keracunan Pb yang spesifik. Misalnya, pada sapi dan kuda akan tampak gejala keracunan yang berbeda. Kuda lebih peka dibanding dengan sapi karena hubungannya dengan kebiasaan cara memakan rumput. Kuda mempunyai kebiasaan memakan rumput dengan mencabut

rumput disertai dengan akarnya dan tanah yang terkontaminasi oleh polutan Pb akan ikut termakan. Pada burung, akan terjadi ketidakmampuan untuk terbang dan inkoordinasi karena paralisis otot sayap sedangkan pada tikus akan terjadi anoreksia apabila mengalami keracunan Pb (Hariono, 2005).

1.3 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Klasifikasi tikus putih menurut Sirosis (2005), antara lain :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



Gambar 2.1. Tikus (*Rattus norvegicus*) (Sirosis, 2005)

Hewan laboratorium atau hewan percobaan dapat digunakan sebagai media dalam penelitian atau pengamatan laboratorik untuk mempelajari dan mengembangkan ilmu pengetahuan. Hewan coba yang banyak digunakan dalam

penelitian adalah tikus, kelinci, hamster, unggas, kambing, domba, sapi, kerbau, kuda dan simpanse. Tikus merupakan hewan yang umum digunakan dalam penelitian, karena mudah dipelihara, secara garis besar fungsi, bentuk organ serta proses biokimianya antara tikus dan manusia memiliki banyak kesamaan (Suckow, 2006). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) digunakan sebagai hewan model intoksikasi dikarenakan memiliki kadar asam amino dan sistem metabolismenya yang hampir sama dengan manusia sehingga memudahkan dalam melakukan penelitian (Miller *et al.*, 2010).

Pemilihan jenis kelamin tikus putih untuk penelitian dipertimbangkan dengan tujuan dari penelitian tersebut. Tikus putih strain wistar banyak dijadikan sebagai hewan percobaan dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain: ekonomis, mudah berkembang biak, mudah disimpan karena ukuran tubuh yang kecil, memiliki perilaku (biologis) tubuh menyerupai manusia, dan mudah beradaptasi dengan lingkungan (Kiara, 2013).

Rattus norvegicus ini memiliki ciri antara lain rambut tubuh berwarna putih dan mata merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm dan bobot pada usia dewasa adalah sekitar 250-500 gram (Suckow, 2006).

1.4 Malondialdehida (MDA)

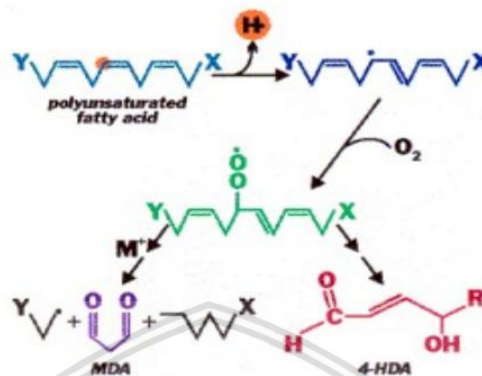
Lipid merupakan target dari radikal bebas yang mengakibatkan oksidatif disertai dengan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid adalah degradasi oksidatif dari asam lemak (Dewi, 2011). Mekanisme metabolisme lipid yang berlebih bisa memicu adanya peroksidasi lipid. Mekanisme terbentuknya oksidasi akibat radikal bebas dan kondisi stres oksidatif pada membran sel, lipoprotein, dan lipid (Girotti,

1998). Radikal bebas berfungsi dalam tubuh sebagai fagositosis, transport elektron dan transduksi signal (Noguchi *et al.*, 1999), namun jika tidak terjadi peningkatan radikal bebas didalam tubuh dapat membentuk peroksidasi lipid yang menghasilkan senyawa MDA (Sunil dan Dinesh, 2009).

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki sebuah elektron tidak berpasangan di orbit luarnya dan bersifat sangat reaktif. Sifat reaktif radikal bebas mengakibatkan pengambilan satu elektron dari molekul lain didekatnya untuk melengkapi rantai elektron yang berdampak pada kerusakan sel. Oksidan merupakan senyawa penerima elektron (*electron acceptor*) yang berfungsi menarik elektron, kesamaan sifat antara oksidasi dan radikal bebas yaitu sama-sama menarik elektron. Radikal bebas digolongkan dalam oksidan, namun tidak setiap oksidan adalah radikal bebas. Senyawa radikal bebas mempunyai sifat reaktivitas tinggi dalam membentuk radikal yang baru sehingga terjadi reaksi rantai (*chain reaction*) yang berhenti apabila direndam (*quenched*) oleh antioksidan (Suryohudoyo, 2000; Hendromartono, 2000; Susi dkk., 2012).

Mekanisme pembentukan *Malondialdehida* (MDA) di dalam tubuh melalui proses peroksidasi lipid pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) (Sholichah dkk., 2012). Peningkatan radikal bebas mengakibatkan proses peroksidasi lipid sehingga terjadi peningkatan pembentukan MDA. Mekanisme terjadinya proses peroksidasi lipid diawali dengan penghilangan atom hidrogen (H) dari molekul lipid tak jenuh rantai panjang oleh gugus radikal hidroksil (OH), sehingga lipid bersifat radikal. Pembentukan radikal lipid tersebut bereaksi dengan atom oksigen (O₂) membentuk radikal peroksil (OO) dan

menghasilkan MDA (Agnes dkk., 2013). Mekanisme pembentukan MDA dapat dilihat pada **Gambar 2.2** dibawah ini.



Gambar 2.2. Mekanisme pembentukan MDA (Agnes dkk., 2013)

1.5 Gambaran Histopatologi Jejunum

Jejunum merupakan bagian tengah dari tiga bagian usus halus yang menempati bagian ventral rongga perut. Jejunum membentuk sekitar 2/5 dari total panjang usus halus. Secara makroskopis, terlihat dengan adanya banyak lipatan pada mukosa. Fungsi penyerapan lebih banyak terjadi pada jejunum. Fungsi utama yakni pemecahan nutrisi (misalnya dengan amilase dan proteinase), penyerapan nutrisi lipofilik (protein, lemak, kolesterol dan vitamin yang larut dalam lemak A, D, E, dan K), dan penyerapan air (Shih *et al.*, 2005). Usus halus merupakan bagian sistem pencernaan yang berfungsi mencerna dan menyerap zat makanan seperti asam amino, lipid dan monosakarida. Usus halus berfungsi untuk absorpsi mikronutrien, mineral, dan vitamin. Usus halus terbagi menjadi tiga bagian yaitu duodenum, jejunum, dan ileum, perbedaan bagian mempengaruhi jenis mikronutrien yang diabsorpsi. Jejunum merupakan bagian usus yang banyak mengabsorpsi mikronutrien. Histologi secara umum terdiri dari tunika mukosa

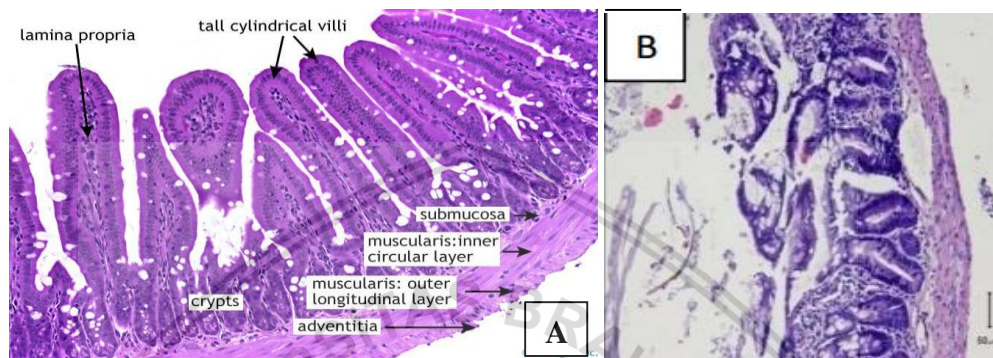
(*lamina epithelia*, *lamina propia*, dan *muscularis mucosae*), submukosa, tunika muskularis (*tunica muscularis*) dan tunika serosa (*tunica serosa*). Penyerapan mikronutrien jejunum terjadi pada vili (sel epitel silindris sebaris) yang terletak pada lapisan mukosa. Vili jejunum terbentuk lebih ramping, kecil dan jumlahnya lebih sedikit dari duodenum (Guyton and Hail, 2008).

Jejunum divaskularisasikan oleh vena jejunaes dan ileum divaskularisasikan oleh vena ileales. Dimana arteri jejunaes dan arteri ileales merupakan cabang dari arteri mesenterica superior yang dicabangkan dari aorta setinggi Vertebrae Lumbal I. Sedangkan, vena jejunaes dan vena ileales juga bermuara ke vena mesenterica superior. Jejunum dan ileum memiliki innervasi yang sama yaitu parasimpatis oleh nervus vagus dan simpatis oleh plexus mesenterica superior dari medulla spinalis segmen toracal VI-XII (Yamato *et al.*, 2009).

Secara histologis, jejunum terdiri dari beberapa lapisan yakni lapisan serosa/adventitia, lapisan muskularis eksterna dan interna, lapisan submukosa, lamina propia, vili-vili dan mikrovili pada **Gambar 2.3**. Jejunum dan ileum memiliki vili vhorialis, yang berfungsi untuk menyerap zat-zat gizi hasil akhir dari proses pencernaan seperti glukosa, fruktosa, galaktosa, peptida, dan asam lemak (Junqueira and Carneiro, 2005; Samuelson, 2007).

Vili pada jejunum lebih panjang daripada duodenum dan ileum. Epitel silindris vili usus selalu mengalami pergerakan dari bagian kriptas menuju apeks vili. Sel epitel vili mengandung filamen aktin dan miosin yang berfungsi untuk pergerakan mikrovili, serta mengandung jaringan terminal sebagai reseptor pelekatan mikroba (Inamoto *et al.*, 2008). Pertahanan fisik pada usus halus manusia

dan hewan diantaranya adalah lapisan epitel, mikroflora normal, dan lendir yang disekresikan oleh sel goblet. Lendir di permukaan mukosa akan mencegah patogen menyerang epitel (David *et al.*, 2006). Gambaran histologi jejunum dapat dilihat pada **Gambar 2.3** dibawah ini.



Gambar 2.3 Gambaran Histologi Jejunum

Keterangan : **A.** Gambaran histologi jejunum normal (Deltabase, 2006).
B. Gambaran histologi jejunum yang mengalami kerusakan villi (Yoga, 2012).

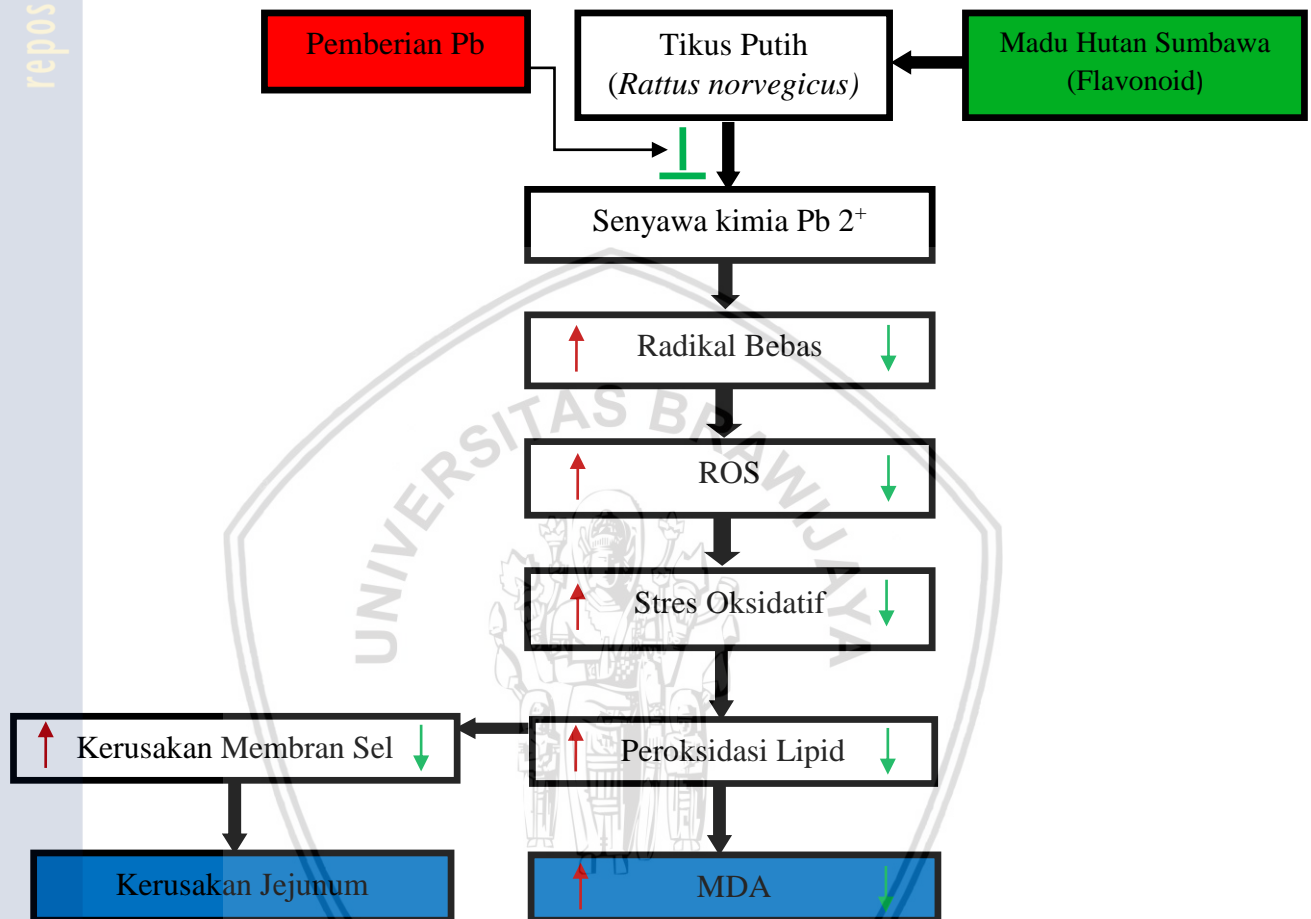
Jejunum merupakan bagian kedua usus halus setelah duodenum yang secara mikroskopis terlihat dapat digerakkan bebas pada mesenteriumnya dan menempati bagian pusat abdomen. Jejunum berfungsi sebagai absorpsi nutrisi makanan yang masuk (Joenoos, 2002). Proses absorpsi merupakan pemindahan hasil akhir pencernaan karbohidrat, lemak dan protein melalui dinding usus ke sirkulasi darah dan limfe untuk digunakan oleh sel-sel tubuh. Makanan tinggi kolesterol yang masuk pada saluran usus berbentuk trigliserida, yang dihidrolisa oleh enzim lipase pankreas dan bergabung kembali menjadi asam lemak bebas, trigliserida, fosfolipid dan kolesterol (Xenoulis and Steiner, 2010).

Pemecahan kilomikron melalui hati dan usus yang diseleksi menjadi kolesterol, sebagai kolesterol bersama dengan trigliserida akan bersatu bersama

apoprotein dan membentuk *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL). VLDL dipecah lagi menggunakan enzim lipoprotein menjadi IDL yang langsung akan mengubah menjadi LDL (Xenoulis and Steiner, 2010). Penyerapan absorpsi lemak melalui metabolisme yang berlebih pada jejunum akan mengakibatkan penyerapan banyak mikronutrien dalam tubuh. Lipid merupakan target dari pembentukan radikal bebas dan menimbulkan proses oksidatif disertai peroksidasi lipid. Radikal bebas merupakan molekul yang tidak memiliki ikatan elektron dan sangat reaktif, sehingga mengambil elektron dari luar untuk bisa melengkapi reaksi berantai. Reaksi peroksidasi lipid yang ditimbulkan oleh ikatan radikal bebas mengakibatkan kerusakan sel, sehingga keadaan jejunum yang mengalami absorpsi lemak berlebih mengakibatkan adanya reaksi peroksidasi lipid yang berdampak pada kerusakan sel (Suryohudoyo, 2000 dan Hendromartono, 2000).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

↓ : Mempengaruhi
 ↑ : Peningkatan
 □ : Hewan coba

↓ : Penurunan
 ⊥ : Menghambat
 → : Terapi

■ : Variabel bebas
 ■ : Variabel terikat
 ■ : Paparan

Hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) diberikan madu hutan sumbawa yang mengandung senyawa flavonoid sebagai terapi preventif untuk mencegah kerusakan organ dalam tubuh sebagai akibat dari pemberian plumbum (Pb). Pb yang diberikan akan masuk melalui mulut (oral) dan menjadi suatu senyawa kimia Pb^{2+} yang memiliki atom bebas pada lapisan terluar. Pb berubah menjadi radikal bebas karena atom yang bebas tersebut berusaha untuk melengkapi lapisan terluar agar lebih stabil dengan mengikat molekul lain dari organ tubuh. Peningkatan radikal bebas dapat menyebabkan terbentuknya ROS. *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan senyawa radikal bebas yang berada di dalam tubuh. Radikal bebas dapat masuk ke dalam pembuluh darah dan merusak endotel. Radikal bebas dalam darah akan berikatan dengan asam lemak tak jenuh berantai panjang *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang memiliki ikatan rangkap sehingga memicu kondisi stres oksidatif serta meningkatkan reaksi peroksidasi lipid pada membran sel. Sifat lipid yang tidak memiliki membran pelindung sebagai komponen membran sel, sensitif terhadap radikal bebas menyebabkan mudah terjadi peroksidasi lipid (Winarsi, 2007). Meningkatnya aktivitas radikal bebas menyebabkan kadar MDA semakin tinggi dan dapat digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas dalam tubuh.

Radikal bebas juga akan merusak susunan membran sel dalam tubuh yang terdiri dari lipid (*lipid bilayer*). Molekul lipid yang mengalami stres oksidatif akan mengalami auto-oksidasi atau lebih dikenal dengan peroksidasi lipid. Protein yang mengalami oksidasi menjadi tidak berfungsi dan DNA yang teroksidasi menjadi

mutagen, karsinogen atau menyebabkan kematian sel sehingga dapat mempengaruhi fungsi dari sel-sel dan jaringan di usus halus.

Salah satu senyawa antioksidan pada madu hutan sumbawa adalah flavonoid. Flavonoid akan bekerja menghambat proses oksidasi melalui penghambatan inisiasi dan propagasi reaksi oksidasi dari radikal bebas. Antioksidan madu hutan sumbawa akan memberikan atom hidrogen untuk menangkap hidroksil sehingga radikal bebas kurang reaktif. Selain itu, antioksidan dapat menurunkan kondisi stres oksidatif dengan cara menyeimbangkan sistem pertahanan tubuh dengan radikal bebas. Apabila stres oksidatif menurun, maka kerusakan peroksida lipid dan protein juga akan menurun sehingga dapat menurunkan kerusakan pada sel-sel dan jaringan di usus halus dan menyebabkan kerja usus halus terutama bagian jejunum tetap baik. *Malondialdehida* merupakan metabolit stabil yang dihasilkan dari reaksi peroksidasi lipid digunakan sebagai penanda stres oksidatif. Pada tahap ini radikal bebas yang berlebih akan bereaksi dengan sel lipid dan protein dimana pengukuran tingkat peroksidasi lipid dapat diukur dengan kadar *Malondialdehida* (MDA) sebagai produk akhir. MDA bersifat toksik terhadap membran sel kemudian bereaksi dengan protein tubuh, sehingga membran sel akan mengalami kerusakan (Malysa, 2014). Pemberian Pb selama 14 hari akan meningkatkan radikal bebas sehingga tercipta kondisi stres oksidatif. Stres oksidatif yang berlebihan di dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya penurunan kadar ROS yang ditandai adanya penurunan kadar MDA. Pemberian terapi preventif madu hutan sumbawa diharapkan dapat mencegah penurunan kadar

MDA dan tetap mempertahankan gambaran histopatologi usus halus terutama jejunum.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Madu hutan sumbawa dapat menurunkan kadar *Malondialdehida* (MDA) tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum (Pb).
2. Madu hutan sumbawa dapat mencegah kerusakan pada organ jejunum sehingga mampu mempertahankan histopatologi organ jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum (Pb).

BAB 4 METODE PENELITIAN

1.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan 12 September 2017 sampai 16 Oktober 2017 di Laboratorium UPT Meteria Medika Batu, Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

1.2 Alat dan Bahan Penelitian

1.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kandang tikus berupa bak plastik dan tutup kandang dari kawat, botol minum tikus, sekam berupa parutan kayu halus, alat sonde, *dissecting set*, papan bedah, sarung tangan, spuit 1 cc, spuit 3 cc, *microtube*, timbangan digital, gelas ukur, cawan petri, spatula, objek glass, cover glass, mikroskop cahaya (*Olympus BX51*), aluminium foil, tabung polipropilen, *vortex*, *centrifuge* (*Thermoscientific Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge*), *micropipette* ukuran 10-100 μL , mortal, pot organ, *tissue*, kapas, kertas saring, *box* pakan, spektrofotometer, *timer* dan lemari pendingin.

1.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar jantan, pakan tikus standar, Pb asetat (*powder*), madu hutan sumbawa, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *aquadest*, NaCl fisiologis, *xylol* bertingkat, alkohol bertingkat, PFA 10%, blok parafin, pewarna *Hematoxyline Eosin* (HE), standar MDA.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dipergunakan apabila media yang digunakan dalam penelitian sama atau dianggap seragam (Kusriningrum, 2008). Pengukuran parameter kadar MDA dan histopatologi jejunum dilakukan *post test on control group*. Rancangan kelompok penelitian dapat dilihat pada **Tabel 4.1**. Secara lengkap skema kelompok perlakuan dan skema kerja penelitian dilihat pada **Lampiran 3**.

Tabel 4.1. Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan	Variabel yang Diamati	
		Kadar MDA	Histopatologi Jejunum
A (Kontrol negatif)	Pakan standar dan air minum		
B (Kontrol positif)	Pakan standar dan air minum + pemberian Pb 10 mg/ekor/hari		
C(Perlakuan 1)	Pakan standar dan air minum + 25 mg/kg BB madu hutan sumbawa + pemberian Pb 10 mg/ekor/hari		
D(Perlakuan 2)	Pakan standar dan air minum + 50 mg/kg BB madu hutan sumbawa + pemberian Pb 10 mg/ekor/hari		
E(Perlakuan 3)	Pakan standar dan air minum + 75 mg/kg BB madu hutan		

sumbawa + pemberian Pb 10
mg/ekor/hari

4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Penentuan jumlah sampel minimal menggunakan rumus $p(n - 1) \geq 15$, dimana (p) adalah jumlah perlakuan dan (n) adalah jumlah ulangan (Kusriningrum, 2008), perhitungan banyaknya ulangan sebagai berikut :

$$p(n - 1) \geq 15$$

$$5(n - 1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Penelitian ini memiliki lima perlakuan, dengan dasar rumus di atas diperoleh jumlah pengulangan sebanyak lebih dari atau sama dengan empat kali. Jumlah pengulangan yang diambil adalah empat, sehingga sampel yang diperoleh pada penelitian ini sebanyak 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan.

4.3.3. Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- a. Variabel bebas : Dosis plumbum (Pb) dan dosis madu hutan sumbawa
- b. Variabel terikat : Kadar MDA dan histopatologi jejunum tikus putih
- c. Variabel kontrol :
 - Tikus putih (*Rattus novergicus*) meliputi jenis kelamin, umur, berat badan, strain Wistar.
 - Madu hutan sumbawa meliputi warna dan konsistensi.

- Pakan.
- Suhu dan lingkungan.

4.4 Karakteristik Sampel Penelitian

4.4.1 Karakteristik Inklusi

- a. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* strain Wistar) umur 8–10 minggu
- b. Berat badan rata-rata 200 gram
- c. Jenis kelamin jantan
- d. Sehat, ditandai dengan gerak yang aktif dan mata yang jernih

4.4.2 Karakteristik Eksekusi

- a. Tikus yang mati dalam perjalanan penelitian atau mengalami sakit

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba dimulai dengan diaklimatisasi hewan coba selama 7 hari di laboratorium. Pemberian pakan selama masa adaptasi berupa pakan standar sesuai kebutuhan yaitu 20 gram/ekor/hari (10% dari berat badan) dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Hewan coba sebanyak 20 ekor dibagi dalam 5 kelompok perlakuan secara acak. Setiap kelompok hewan coba terdiri dari masing-masing 4 ekor hewan coba. Tikus dikandangkan sesuai kelompok perlakuan dan dipelihara pada ruang bersuhu 26–27°C dengan kelembaban ruang 83% (Lina dkk., 2003).

4.5.2 Penentuan Dosis Madu

Madu yang digunakan dalam penelitian ini adalah madu hutan sumbawa yang diperoleh dari hutan produksi di Sumbawa. Pada penelitian Al – Yahya *et al.* (2013) telah dilakukan *Acute Toxicity Test* pada tikus untuk mengetahui LD₅₀ melalui peroral. Hasilnya yakni tidak ditemukan gejala toksisitas madu hingga dosis 5 g/kg BB. Dengan dasar ini maka dosis yang akan diujikan yaitu masing-masing 25mg/kg BB untuk kelompok C, 50 mg/kg BB untuk kelompok D dan 75 mg/kg BB untuk kelompok E.

Madu yang digunakan mempunyai konsentrasi 1,21 g/mL dan berat tikus yang digunakan adalah rata-rata 200 g. Madu hutan sumbawa diberikan pada hewan coba kelompok C, D, E. Dosis terapi preventif madu kelompok C sebesar 25 mg/kg BB, pada kelompok D sebesar 50 mg/kg BB, sedangkan kelompok E sebesar 75 mg/kg BB yang diberikan 1 mL lalu disondekan ke lambung tikus 1 kali sehari selama 28 hari. Penentuan dosis madu berdasarkan pada penelitian Khadr (2007). Volume larutan yang disondekan adalah tiap dosis madu yang telah diencerkan dengan aquades. Terapi preventif madu hutan sumbawa pada kelompok perlakuan C, D, E dilakukan sehari sekali selama dua minggu berturut-turut menggunakan sonde pada **Lampiran 4**.

4.5.3 Pemberian Plumbum (Pb)

Plumbum (Pb) yang diberikan adalah Pb dalam bentukan serbuk berwarna putih yang dilarutkan dengan aquades 1 mL dan diberikan per oral dengan menggunakan sonde lambung. Plumbum diberikan 10 mg/ekor/hari pada kelompok B kontrol positif, kelompok perlakuan C, perlakuan D dan perlakuan E selama 2 minggu (14 hari), karena menurut penelitian sebelumnya dengan

pemberian Pb sebanyak 10 mg/hari selama 14 hari dapat menyebabkan peningkatan degenerasi dan nekrosis sel-sel organ (Suprijono dkk., 2011). Pemberian plumbum dan perhitungan dosis secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 5.**

4.5.4 Pengambilan Organ Jejunum Tikus

Pengambilan organ jejunum tikus dilakukan setelah perlakuan 4 minggu selesai dilakukan. Pengambilan organ jejunum dilakukan dengan cara euthanasi melalui dislokasi pada leher tikus, kemudian fiksasi ke empat kaki tikus. Pembedahan dilakukan pada rongga abdomen, dimana tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal di atas papan bedah. Selanjutnya dilakukan pembedahan abdomen dari arah caudal ke cranial hingga terbuka rongga thorax. Kemudian jejunum diambil dan dipotong menggunakan gunting bedah yang sebelumnya dibilas dengan aquades, kemudian jejunum dipotong menjadi 2 bagian yaitu bagian pertama disimpan dalam PBS-azida pH 7,4 untuk pengukuran kadar MDA menggunakan TBARC, sedangkan bagian kedua disimpan dalam larutan PFA 10% untuk pembuatan preparat histopatologi menggunakan pewarnaan HE **Lampiran 6.**

4.5.5 Pengukuran Kadar *Malondialdehida* (MDA)

Standar MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 mg/ml masing-masing diambil 100 µl, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, setelah itu ditambahkan 550 µL aquades. Setiap tabung tersebut ditambahkan 100 µL TCA 100%, 250 µL HCl 1N, 100 µL Na-Thio 1%, dan campuran yang terbentuk dihomogenkan dengan *vortex*. Tabung ditutup dengan plastik dan diberi lubang.

Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Setelah itu, didinginkan pada suhu ruangan. Larutan standar kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum (530 nm) menggunakan spektrofotometer (Shimadzu *UV-visible spectrophotometer* UV-1601). Kurva standar MDA dihasilkan dari persamaan regresi antara absorbansi (y) dan konsentrasi MDA (x) (Amin dkk., 2009) pada **Lampiran 7**.

Kadar MDA dianalisis menggunakan metode uji *Thioarbituric Acid Reactive Substance* (TBARSC) dengan spektrofotometri. Prinsip metode ini berdasarkan kepada kemampuan pembentukan kompleks berwarna merah jambu antara MDA dan asam thiobarbiturat (TBA) dengan prosedur sebagai berikut: sebanyak 0,5 g jejunum ditimbang bersama pasir kuarsa digerus dengan mortar hingga halus. Kemudian ditambahkan 200 μ L NaCl fisiologis ke dalam mortar dan berbentuk homogenat dimasukkan ke dalam tabung microtube disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit. Larutan tersebut ditambah 550 μ L aquades dihomogenkan kemudian ditambahkan 100 μ L TCA dan dihomogenkan kemudian ditambah 250 μ L HCl 1N dan dihomogenkan kembali. Campuran ditambah 100 μ L Na-Thio 1% dan dihomogenkan selanjutnya diinkubasi dalam waterbath 100°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan pada suhu ruang dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang telah dipanaskan selanjutnya didinginkan pada temperatur ruang. Setelah itu ditentukan nilai absorbansi sampel menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Agnes, dkk., 2013) pada **Lampiran 7**.

4.5.6 Histopatologi Jejunum

4.5.6.1 Pembuatan Preparat dan Perwarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE)

Histopatologi Jejunum

Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, deparafinasi, rehidrasi, perwarnaan, dehidrasi, *clearing* dan *mounting* (Junquiera and Carneiro, 2005). Tahapan pembuatan preparat dimulai dengan melakukan fiksasi yaitu merendam organ jejunum dalam PFA 10% selama 24 jam. Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, dan mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai.

Tahap selanjutnya adalah dehidrasi, dilakukan untuk mengeluarkan air dari jaringan agar jaringan tersebut dapat diisi oleh parafin sehingga jaringan dapat diiris tipis. Proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya adalah tahap penjernihan organ (*clearing*) dilakukan dengan mulai pemindahan jaringan ke larutan penjernihan yaitu xylol I (1 jam), xylol II dan xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator).

Selanjutnya adalah *embedding*, dimana organ dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam dan kemudian diambil dengan pinset dan dilanjutkan pemblokkan dengan parafin blok yang berukuran sesuai dengan tempat blok *microtome*. *Embedding* berfungsi agar organ lebih padat. Blok tersebut dipasang pada *microtome* dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong (*sectioning*) dengan ketebalan 5 µm dan direndam pada *water bath* dengan suhu 38–40°C. Awal pemotongan dilakukan *trimming*

karena jaringan yang dipotong masih belum sempurna. Kemudian irisan yang didapat diletakkan pada *object glass*. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37-38°C selama semalam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Wati dkk., 2013).

Tahapan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) dimulai dengan tahapan deparafinasi yaitu dengan memasukkan preparat ke dalam xylol bertingkat I–III masing-masing selama 5 menit. Tujuan adalah untuk menghilangkan/melarutkan parafin yang terdapat pada jaringan. Selanjutnya, dilakukan tahapan rehidrasi, dimana preparat dimasukkan dalam alkohol, mulai dari alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit, lalu direndam dalam aquades selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan perwarnaan preparat yang dimasukkan dalam pewarna *hematoxyline* selama 10 menit. Tujuannya adalah untuk memberi warna pada inti sel atau nukleus. Kemudian dicuci dengan aquades selama 5 menit, dibilas dengan aquades dan dimasukkan ke dalam pewarna *eosin* selama 5 menit. Tujuannya adalah untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel. Selanjutnya, preparat direndam dalam aquades untuk menghilangkan pewarna *eosin* yang masih menempel.

Tahap selanjutnya adalah dilakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol bertingkat dari 70%, 80%, 90% dan 95% yang bertujuan untuk menghilangkan air dari jaringan. Selanjutnya, dilakukan *clearing* dengan memasukkan preparat pada xylol I–III dan dikeringkan. Selanjutnya, dilakukan *mounting* dengan menggunakan entellan (Jusuf, 2009). Pembuatan preparat dan

pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) secara lengkap dijelaskan pada **Lampiran 7**.

4.5.6.2 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histologi jejunum dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX51* 4 lapang pandang dengan perbesaran 100x dan 400x. Pengamatan histopatologi jejunum yang diamati adalah lapisan mukosa dengan bentukan vili-vilinya serta tanda-tanda terjadinya kerusakan struktur vili, hiperplasia sel goblet serta erosi sel epitel.

4.6 Analisa Data

Data penelitian kadar *Malondialdehida* (MDA) yang diperoleh dari hasil perlakuan dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam *one way ANOVA* menggunakan *software SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 22,0*. Dan dilakukan uji lanjutan $\text{BNJ } \alpha = 5\%$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan, sedangkan gambaran histopatologi dianalisis deskriptif dengan membandingkan kerusakan jaringan antar kelompok.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa yang Diinduksi Plumbum (Pb) Terhadap Kadar *Malondialdehida* (MDA)

Pengukuran kadar MDA menggunakan uji *Thioarbituric Acid Reactive Substance* (TBARSC) bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian madu hutan Sumbawa dalam menurunkan kadar MDA organ jejunum pada tikus (*Rattus norvegicus*). Hasil penelitian didapatkan bahwa pemberian terapi madu hutan sumbawa pada tikus menunjukkan penurunan kadar MDA dan memberikan hasil yang signifikan ($p < 0,01$). Hasil pengukuran kadar MDA dapat dilihat pada **Tabel 5.1 dan Lampiran 9**.

Tabel 5.1 Kadar rata-rata *Malondialdehida* (MDA)

Kelompok	Rata-rata kadar MDA $\mu\text{g/mL}$	Kadar MDA (%)	Penurunan kadar MDA terhadap K+ (%)
Kontrol negatif	$0,012 \pm 0,001^a$	36,36%	63,63%
Kontrol positif	$0,033 \pm 0,000^d$	100%	-
P1 25 mg/kg BB	$0,032 \pm 0,003^d$	96,96%	3,03%
P2 50 mg/kg BB	$0,026 \pm 0,001^c$	78,78%	21,21%
P3 75 mg/kg BB	$0,018 \pm 0,000^b$	54,54%	45,45%

Keterangan :

- Notasi (a, b, c dan d) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,01$) antara perlakuan.

Berdasarkan **Tabel 5.1** diketahui hasil analisa statistik menunjukkan bahwa penggunaan madu hutan sumbawa dapat mempengaruhi kadar MDA jaringan. Kadar MDA menunjukkan bahwa terjadi penurunan pada kontrol

positif (hewan sakit) dengan nilai kadar MDA $0,033 \mu\text{g/ml} \pm 0,000$ jika dibandingkan dengan kontrol negatif (hewan sehat) dengan nilai kadar MDA $0,012 \mu\text{g/ml} \pm 0,001$ sebesar 63,63%. Kadar MDA pada kontrol negatif (tikus sehat) merupakan kadar MDA yang dapat direspon tikus normal, oleh karena itu digunakan sebagai pembanding untuk menentukan adanya penurunan atau peningkatan yang terjadi pada perlakuan. Penurunan MDA dapat digunakan sebagai indikator perbaikan kerusakan jaringan (Mudassir, 2012). Peningkatan kadar MDA pada tikus yang sakit dikarenakan Pb akan masuk ke dalam organ pencernaan melalui kanal Ca^{2+} dan meningkatkan influk Ca^{2+} , sehingga terjadi akumulasi pada sitoplasma (Wahyuningsih, 2008). Akumulasi Ca^{2+} yang banyak di sitoplasma akan mengganggu aktivitas dari mitokondria, sehingga rantai respirasi menjadi terganggu dan memicu terjadinya radikal bebas. Peningkatan radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan menyebabkan kondisi stres oksidatif. Hal ini terjadi karena jumlah radikal bebas dengan antioksidan intrasel tidak seimbang dan dapat memicu terjadinya peroksidasi lipid dan dihasilkan produk akhir berupa MDA.

Kelompok perlakuan 1 (hewan yang diberi terapi preventif madu hutan sumbawa dosis 25 mg/kg BB) menunjukkan kadar MDA sebesar $0,032 \mu\text{g/ml} \pm 0,003$ yang tidak signifikan ($P < 0,01$) terhadap kelompok kontrol positif sebesar $0,033 \mu\text{g/ml} \pm 0,000$. Jika dibandingkan dengan kontrol positif, penurunan nilai kadar MDA pada kelompok perlakuan 1 yaitu sebesar 3,03%. Dosis 25 mg/kg BB tersebut kurang efektif karena tidak dapat menurunkan kadar MDA. Hal ini tidak sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pratama (2016), bahwa dosis 25

mg/kg BB mampu menurunkan kadar MDA dibandingkan dengan kelompok positif. Perbedaan tidak signifikan dalam penelitian Kamilatussaniah (2015) menyatakan, masuknya Pb ke dalam tubuh pada kadar tertentu dapat menyebabkan terjadinya perubahan pada beberapa molekul tubuh sehingga pada akhirnya fungsi tubuh akan terganggu. Organ yang mengalami gangguan fungsi tubuh salah satunya adalah jejunum. Jejunum merupakan organ yang berfungsi untuk absorpsi, menerima nutrisi makanan yang sudah dicerna kemudian diserap oleh sistem peredaran darah untuk disebarkan ke seluruh tubuh. Kerusakan jejunum yang disebabkan oleh Pb dapat menginduksi pembentukan radikal bebas serta menurunkan aktivitas dan produksi antioksidan endogen dengan demikian akan terjadi stres oksidatif.

Kelompok perlakuan 2 (hewan yang diberi terapi preventif madu hutan sumbawa dosis 50 mg/kg BB) menunjukkan penurunan kadar MDA sebesar $0,026 \mu\text{g/ml} \pm 0,001$, penurunan yang terjadi sebesar 21,21% yang berbeda signifikan ($P < 0,01$) terhadap kelompok kontrol positif sebesar $0,033 \mu\text{g/ml} \pm 0,000$. Kelompok perlakuan 3 (hewan yang diberi terapi preventif madu hutan sumbawa dosis 75 mg/kg BB) menunjukkan penurunan kadar MDA sebesar $0,018 \mu\text{g/ml} \pm 0,000$ dibandingkan dengan kontrol positif sebesar $0,033 \mu\text{g/ml} \pm 0,000$ yang menunjukkan berbeda signifikan ($P < 0,01$) karena kandungan flavonoid dalam madu pada kelompok perlakuan 3 mempengaruhi penurunan kadar MDA. Penurunan pada kelompok perlakuan 3 yaitu sebesar 45,45%.

Terapi preventif madu hutan sumbawa terbukti mampu menghambat peningkatan kadar MDA, hal ini dapat juga diperkuat dari hasil histopatologi

jejunum pada **Gambar 5.1**. Seluruh kelompok perlakuan terapi preventif (1, 2, 3) memberikan pengaruh nyata ($P < 0,01$) terhadap hambatan penurunan kadar MDA. Kelompok terapi preventif 1, 2, 3 memiliki presentase hambatan penurunan kadar MDA masing-masing sebesar 3,03%, 21,21%, dan 45,45% yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif yang tidak diberikan terapi preventif madu hutan sumbawa. Berdasarkan uji Tukey, kelompok terapi preventif yang terbaik ditunjukkan pada kelompok perlakuan 3 dengan dosis 75 mg/kg BB yang tidak menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kontrol negatif. Hal ini menunjukkan dosis 75 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam menghambat kenaikan kadar MDA hingga mendekati kondisi normal (kontrol negatif).

Adanya hambatan penurunan kadar MDA pada kelompok perlakuan terapi preventif 1, 2, dan 3 dibandingkan dengan tikus kontrol positif (hewan sakit) disebabkan karena madu hutan sumbawa mengandung senyawa flavonoid. Berdasarkan hasil uji fitokimia secara kualitatif pada **Lampiran 2**, madu hutan sumbawa memiliki kandungan flavonoid. Kandungan flavonoid tersebut berfungsi sebagai antioksidan tambahan yang berperan dalam peningkatan radikal bebas untuk dinetralkan dan menghambat reaksi peroksidasi lipid. Menurut Middleton *et al* (2000), bahwa didalam madu hutan sumbawa mengandung flavonoid yang merupakan senyawa yang paling efektif sebagai penangkap spesies reaktif, misalnya superoksida, radikal peroksil dan peroksinitrit dengan cara mentransfer atom H^+ , sehingga dapat menjaga sel-sel dari kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Hal ini diperkuat dengan penelitian Jamilyadhaty (2013), bahwa madu hutan sumbawa memiliki aktivitas antioksidan terbaik karena berbagai

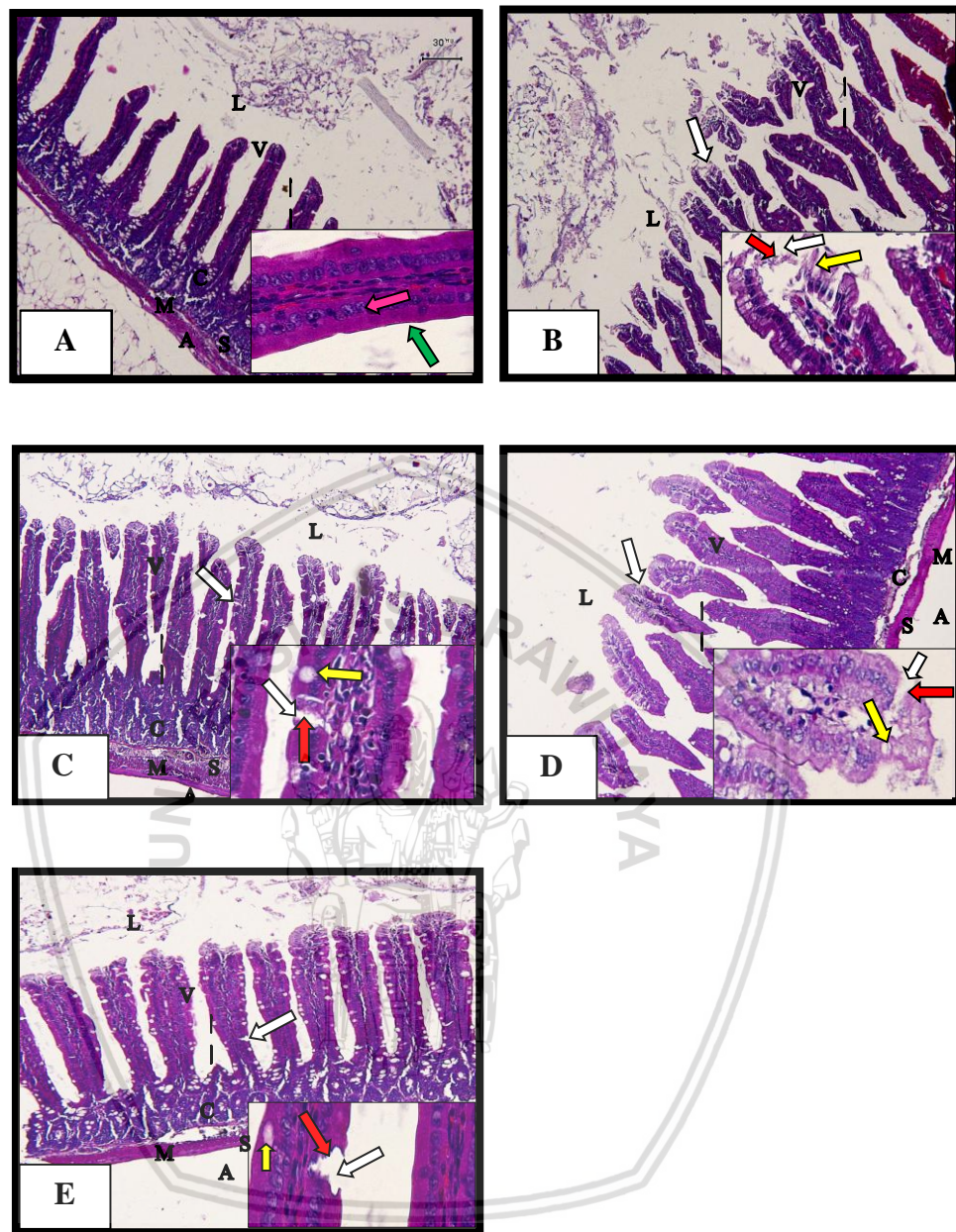
macam kandungan flavonoid yang mampu merendam radikal bebas dibandingkan madu budidaya.

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi atau zat yang mampu menetralkan radikal bebas (Widjaya, 2003). Pemberian Pb pada penelitian ini akan meningkatkan kadar radikal bebas didalam tubuh sehingga terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan endogen yang menyebabkan stres oksidatif. Oleh karena itu memerlukan antioksidan eksogen untuk menetralkan kadar radikal bebas di dalam tubuh diantaranya menggunakan terapi preventif madu hutan sumbawa.

Penggunaan terapi preventif madu hutan sumbawa dosis 75 mg/kg BB menunjukkan peningkatan kadar MDA paling rendah dan mendekati kadar MDA kontrol negatif (hewan sehat), sehingga penggunaan terapi preventif madu hutan sumbawa dosis 75 mg/kg BB merupakan dosis madu hutan sumbawa yang terbaik dalam penelitian ini.

5.2 Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa yang Diinduksi Plumbum (Pb) Terhadap Histopatologi Jejunum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

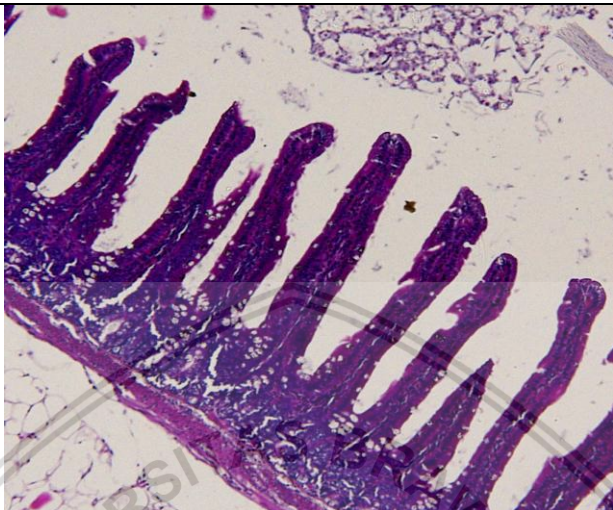
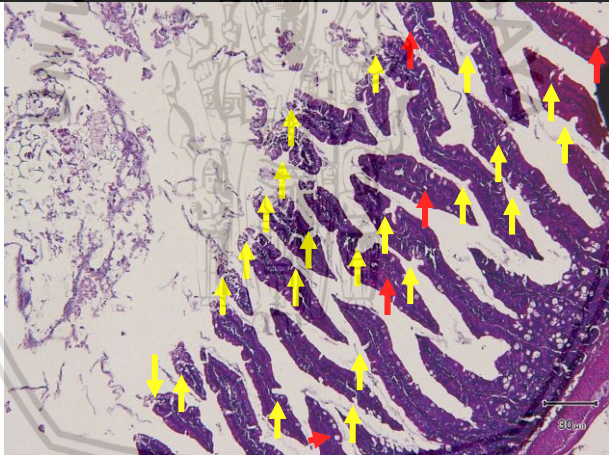
Berikut ini adalah hasil pengamatan histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*).

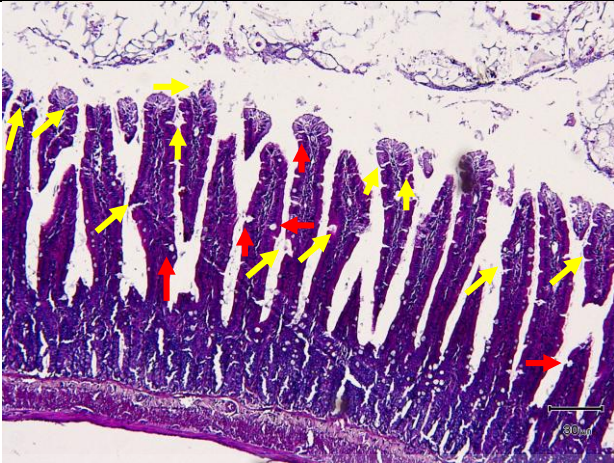




Gambar 5.1 Histopatologi organ jejunum tikus (pewarnaan HE 100x dan 400x)

Keterangan: (A) Tikus sehat; (B) Tikus yang diinduksi Plumbum; (C) Terapi preventif dosis 25 mg/Kg BB; (D) Terapi preventif dosis 25 mg/Kg BB; (E) Terapi preventif dosis 25 mg/Kg BB; (🟩) tunika mukosa jejunum yang tidak mengalami kerusakan, (🟪) sel epitel normal (🔴) kerusakan struktur vili, (⬜) erosi sel epitel, (🟡) hiperplasia sel goblet. Kemudian lumen (L), vili (V), tunika mukosa (TM), submukosa (S), muskularis (M), adventitia (A) dan crypt (C).

Tabel 5.2 Perbedaan Histopatologi Jejunum

Kelompok	Gambar Histopatologi	Keterangan
Kontrol negatif (A)		Tunika mukosa tidak mengalami kerusakan Sel epitel normal
Kontrol positif (B)		→ = Hiperplasia sel goblet → = Kerusakan struktur vili dan erosi sel epitel

<p>P1 25 mg/kg BB (C)</p>		<p>→ = Hiperplasia sel goblet</p> <p>→ = Kerusakan struktur vili dan erosi sel epitel</p> <p>Perbaikan tunika mukosa</p>
<p>P2 50 mg/kg BB (D)</p>		<p>→ = Hiperplasia sel goblet</p> <p>→ = Kerusakan struktur vili dan erosi sel epitel</p> <p>Perbaikan tunika mukosa</p>

<p>P3 75 mg/kg BB (E)</p>		<p>→ = Hiperplasia sel goblet</p> <p>→ = Kerusakan struktur vili dan erosi sel epitel</p> <p>Perbaikan tunika mukosa</p>
-----------------------------------	--	--

Pengamatan preparat histopatologi jejunum dengan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) menggunakan perbesaran 100x dan 400x dengan mengamati struktur vili, sel epitel, dan sel goblet pada **Gambar 5.1**. Secara normal, jejunum terdiri dari empat lapisan, yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskulari dan tunika serosa (Eroschenko, 2008).

Tunika mukosa terdapat vili, sel epitel, dan sel goblet. Kelompok tikus sehat pada **Gambar 5.1 A**, menunjukkan gambaran histologi jejunum tikus sehat yang tanpa diberi perlakuan induksi Pb. Gambaran histopatologi kontrol negatif dan kontrol positif yang diamati adalah perubahan pada struktur vili, sel epitel, sel goblet dan perbaikan tunika mukosa. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui perubahan gambaran histopatologi kontrol positif diberi perlakuan induksi Pb secara peroral.

Kelompok tikus sakit pada **Gambar 5.1 B**, menunjukkan adanya kerusakan pada struktur vili, erosi sel epitel, hiperplasia sel goblet dan perbaikan tunika

mukosa. Vili berfungsi untuk memperluas permukaan penyerapan, sehingga proses absorpsi nutrisi dapat berjalan dengan baik (Abdullah, 2007). Panjang vili jejunum lebih ramping, kecil dan jumlahnya lebih sedikit dari duodenum. Kerusakan struktur vili terjadi karena erosi dari sel epitel. Hal ini terjadi karena Pb yang masuk ke kanal Ca^{2+} dapat meningkatkan influk Ca^{2+} di sel epitel jejunum, sehingga terjadi akumulasi Pb di sitoplasma. Hal ini menyebabkan aktivitas di mitokondria menjadi terganggu dan memicu terjadinya radikal bebas. Peningkatan radikal bebas akan memicu munculnya peroksidasi lipid dan terjadinya kematian sel melalui jalur apoptosis intrinsik yang diawali dengan hilangnya potensial membran mitokondria yang dapat melepaskan cytochrome c ke cytosol (Murphy, 2009). Menurut Dambal (2012), munculnya peroksidasi lipid dapat mempengaruhi fluiditas, struktur dan fungsi membran sel.

Sel goblet berfungsi untuk mensintesis dan mensekresikan musin glikoprotein dengan tujuan untuk melindungi dan melumasi mukosa jejunum. Musin yang disintesis merupakan campuran dari air, glikoprotein, glikolipid, elektrolit-elektrolit, enzim, garam, dan sekresi kelenjar. Ketika musin sel goblet terlepas ke dalam lumen akan berikatan dengan imunoglobulin menghasilkan efek antitoksin permukaan mukosa (Harnett, 1997). Oleh karena itu sel goblet akan semakin banyak memproduksi musin yang digunakan sebagai bentuk pertahanan jejunum dari zat toksik (Specian, 1991).

Penggunaan madu hutan sumbawa dosis 75 mg/kg BB pada **Gambar 5.1 E**, terlihat memiliki kesamaan dengan kontrol negatif atau hewan sehat pada **Gambar 5.1 A**, dimana menunjukkan kerusakan struktur vili, erosi sel epitel, hiperplasia sel

goblet serta adanya perbaikan tunika mukosa. Penggunaan madu hutan sumbawa dosis 50 mg/kg BB pada **Gambar 5.1 D**, dan madu hutan sumbawa dosis 75 mg/kg BB pada **Gambar 5.1 E**, terlihat adanya kerusakan pada struktur vili, erosi sel epitel, hiperplasia sel goblet dan perbaikan tunika mukosa. Hiperplasia sel goblet merupakan mekanisme pertahanan dari organ jejunum dari zat toksik. Oleh karena itu, penggunaan madu hutan sumbawa dosis 75 mg/kg BB dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang terbaik.

Madu mengandung vitamin A, C, E, asam organik, fenol dan flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan serta penangkal radikal bebas (Astarika, 2011). Kandungan senyawa antioksidan di dalam madu hutan sumbawa berupa flavonoid yang merupakan senyawa fenolik, antioksidan pada madu umumnya merupakan senyawa fenolik, sehingga senyawa flavonoid dalam madu hutan sumbawa memiliki fungsi sama sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas dan mencegah terbentuknya peroksidasi lipid (Giorgio, 2000).

Flavonoid didalam madu hutan sumbawa berfungsi sebagai antioksidan yang mencegah terjadinya kerusakan sel akibat radikal bebas dan memperbaiki kerusakan sel akibat radikal bebas. Antioksidan berfungsi membantu tunika mukosa jejunum menunjang kerjanya sebagai penyerapan nutrisi makanan yang masuk melalui proses enzimatis secara normal. Pada hasil pengamatan histopatologi jejunum tikus diterapi madu hutan sumbawa menunjukkan perbaikan gambaran terbaik yaitu pada terapi madu hutan sumbawa dosis 75 mg/kg BB.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan data hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian terapi madu hutan sumbawa dosis 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 75 mg/kg BB menurunkan kadar *Malondialdehida* (MDA) jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) terhadap induksi plumbum, dengan dosis terbaik adalah 75 mg/kg BB sebesar 45,45%.
2. Pemberian terapi madu hutan sumbawa memperbaiki histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan dosis terbaik yaitu 75 mg/kg BB.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis madu hutan sumbawa yang optimal untuk terapi tikus putih (*Rattus novergicus*) terhadap induksi Plumbum.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, E. M, Saktiyono dan Lutfi. 2007. *IPA Terpadu SMP dan MTS Jilid 2A*. Erlangga
- Agnes, R. Y., Aulanni'am dan P. Sasangka. 2013. *Kadar Melondialdehid (MDA) dan Gambaran Histologi Pada Ginjal Tikus Putih (Rattus novergicus) Pasca Induksi Cylosporine-A.1. Kimia Student Journal*. (2) : 222-228.
- Al-'Id, M. S. 2010. *Pengobatan dengan Madu Cetakan 1*. Pustaka Al-Kautsar. Jakarta Timur. 3: 15-17.
- Al-Yahya, Mohammed., Ramzi, Mothana., Mansour, Al-Said. 2013. Attenuation of CCl₄-Induced Oxidative Stress and Hepatonephrotoxicity by Saudi Sidr Honey in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 569037. Doi:10.1155/2013/569037.
- Aljadi A.M dan Kamaruddin, M.Y. 2004. Evaluation of The Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Two Malaysian Floral Honeys. *Food Chem* 85 : 443.
- Amin, M.H.F., A.P.W. Marhendra, dan Aulanni'am. 2009. *Pengaruh Paparan Lipopolisakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas pada Tikus Asma. Paper Presentasi pada Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki, Malang*. 437-447.
- Ardyanto, D. 2005. Deteksi Pencemaran Timah Hitam (Pb) dalam Darah Masyarakat yang Terpajan Timbal (Plumbum). *Jurnal Kesehatan Lingkungan* 1 (2) ; 67-76.
- Astarika, A. G. 2011. *Pengaruh Pemberian Madu terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Diabetes. Skripsi UNISSULA*. 50-58.
- Baltrusaitylė, V., Venskutonis, P.R. and Ceksterytė, V. 2007. Radical Scavenging Activity of Different Floral Origin Honey and Beebread Phenolic Extracts. *Food Chemistry*. 101 : 502-514.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M. and Facino, R.M. 2005. Standardization of antioxidant Properties of Honey by A combination of Spectrophotometric/Flourimetric Assays and Chemometrics. *Anal. Chim. Acta*. 533 : 185-191.
- Chiroma, T.M., B.I. Abdulkarim, and H.M. Kefas. 2007. The impact of pesticide application on heavy metal (Cd, Pb and Cu) levels in Spinach. *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*. ISSN 1583-1078. Vol. 11 : 117-122.

- Dambal, S. S. Dan S. Kumari. 2012. *Evaluation of Lipid Peroxidation and Total Antioxidant Status in Human Obesity*. International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences 2(3): 62-68.
- Deltabase. 2006. *Digestive System*. Deltagen Inc. <http://www.deltagen.com>. [11 Juni 2017]
- Dewi, I. G dan A. Ratnawati. 2011. *Pemberian Growth Hormone Memperbaiki Profil Lipid dan Menurunkan Kadar MDA (Melondyaldehyde) pada Tikus Jantan yang Dislipidemia* [tesis]. Program Pascasarjan. Universitas Udayana.
- Eroschenko, V. P., 2008. *Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations-11th edition*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Fenga, C., Cacciola, A., Martino, L.B., Calderaro, S.R., Di Nola, C., Verzera, A., Trimarchi, G., Gemano, D. 2006. *Relationship of Blood Lead Levels to Blood Pressure in Exhaust Battery Storage Workers*. Industrial Health 44 : 304-309.
- Ferreira, I.C.F.R., Aries, E., Barreira, J.C.M., Estevinho, L.M., 2009. Antioxidant Activity of Portuguese Honey Samples: Different Contributions of The Entire Honey and Phenolic Extract. *Food Chem*, 114 : 1438-1443.
- Giorgio, P. 2000. *Flavonoid an Antioxidant*. *Journal National Product*. 63: 1035-1045.
- Girotti, A. W. 1998. *Lipid hydroperoxide generatio, turnover, and effector action in biological systems*. *The Journal of Lipid Research*. 39 : 1529-1542.
- Guyton and Hall. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran edisi 11*. Jakarta: EGC.
- Hariono, B. 2005. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Hendromartono, S. 2000. *Peran Radikal Bebas terhadap Komplikasi Vaskuler*. *Majalah Penyakit Dalam Udayana*. 1 : 89-92.
- Harnett, W., M. MacDonald, G. Preece, M. Patterson and M. E. Parkhouse. 1997. *Productions of Monoclonal Antibodies Against Excretory-Secretory Products of Adult Male Onchoecerca gibsoni*. *J. of Parasitol*. 83:2 (1997), 316-319.
- Inamoto, T., M. Namba., W. M. Qi., K. Yamamoto., Y. Yokoo., H. Miyata., J. Kawano., T. Yokoyama., N. Hoshi., and H. Kitagawa. 2008. An immunohistochemical detection of actin and myosin in the indigenous bacteria-adhering sites of microvillous columnar epithelial cells in Peyer's patches and intestinal villi in the rat jejunoileum. *Journal of Veteriner Medicine* 70 (11) : 1153-1158.

- Jain, N. B., F. Laden, and U. Guller. 2005. Relation between Blood Lead Levels and Childhood Anemia in India. *American Journal Epidemiol* 161 : 968-973.
- Jamilyadhatus, S. 2013. *Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Tiga Jenis Madu Hutan Indonesia* [Skripsi]. Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Joenoos, Z. N. 2002. *Ars Prescribendi Jilid 3*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Julmansyah. 2010. *Madu Hutan Menekan Deforestasi. Jalan Lain Konservasi DAS dan Adaptasi Perubahan Iklim*. Jaringan Madu Hutan Sumbawa (JMHS). Pondok Madu Rakyat Desa Batudulang, Kecamatan Batulanteh.
- Junquerira, L. C. Jose Carneiro, 2005. *Basic Histology Text & Atlas: Female Reproductive System. 11th ed.* United States of America: McGraw Hill.
- Jusuf, A. A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Depok.
- Kamilatussaniah., A, Yuniastuti., R, S, Iswari. 2015. Pengaruh Suplementasi Madu Kelengkeng Terhadap Kadar TSA dan MDA Tikus Putih yang Diinduksi Timbal (Pb). *Jurnal MIPA* 38 (2) (2015): 108-114.
- Kiara, C. 2013. *Alasan Tikus Dipilih sebagai Hewan Percobaan*. <http://www.ceritamu.com/cerita/Alasan-Tikus-Dipilih-Sebagai-Hewan-Percobaan>. [Diakses pada 07 Desember 2014].
- Kusriningrum R. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan Rancangan Acak Lengkap*. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lina, H.S., S. Listyawati, dan Sutarno. 2003. Analisis Kimia-Fisika Urin Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Setelah Pemberian Daun Seldri (*Apium graveolens*linn). *Journal of Biosmart* 1(5) : 43-46.
- Maryani, Retno., Alviya, Iis., Budiarifanti, Virni dan Salmiah, Mimi. 2013. Melestarikan Lanskap Hutan Sumbawa melalui Penguatan Kelompok Tani Madu Hutan. Laporan Internal Proyek PKPP, Kerjasama Kemen RISTEK bersama Kementerian Kehutanan dan Pemerintah Kabupaten Sumbawa. Sumbawa Besar. Vol 7 : 13.
- Middleton, AA, Mekawy, ME, Moawad, MS and Ahmed, AM. 2000. Comparative Study on The Protective Effects of Some Antioxidants Againsts CCl₄ Hepatotoxicity in Rats. *Egyptian Journal of Natural Toxins*, Vol. 6, No. 1: 59-82.

- Miller, S.D., J.C. Russel., H.E. MacInnes., J. Abdelkrim., and R.M. Fewster. 2010. Multiple Penernity in Wild Population of Invasive Rattus Species. *New Zealand Journal of Ecology* 34(3) : 360-362.
- Mostafa, M. F., Imbrahim, H. S., Mohamed, Y. A., Ahamed, S. M., and Hegazy, A. M. 2010. Effect of Alpha Acid and Vitamin E on Heavy Metals Intoxication in Male Albino Rats. *Journal of America Science* 6 (8) : 56-63.
- Mudassir, A. Aziz, dan A. Q. Punagi. 2012. *Analisis Kadar Malondialdehid (Mda) Plasma Penderita Polip Hidung Berdasarkan Dominasi Sel Inflamasi Pada Pemeriksaan Histopatologi*. Makasar: Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.
- Murphy, M. P. 2009. *How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. Review Article. Biochem. J*; 417: 1-13.
- Napitupulu, R.R.J. 2008. *Pengaruh Pemberian Kalsium Secara Oral Terhadap Kadar Plumbum Dalam Darah Mencit (Mus musculus L)*. Medan: USU Repository.
- Noguchi, Nokio and N. Etsuo. 1999. *Chemistry of Active Oxygen Species and Antioxidants*. Andreas M. Papas (ed.) Adntioxidant Status, Diet, Nutrition and Health. CRC Press. USA.
- Nugroho, H. 2006. Pengaruh Pemberian Timbal Asetat Per Oral Terhadap Gambaran Histologis Epitel Jejunum Mencit (Mus Musculus). *Jurnal Bina Praja* 8(3) : 113-120.
- Palar, H. 2004. *Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat*. Jakarta: Rineka Cipta
- Parwata, I. M., K. Ratnayani and A. Listia. 2010. *Aktivitas antiradical bebas serta kadar beta karoten pada madu kapuk (Cieba pentandara) dan madu kelengkeng (Nephelium longata L.)*. J. Kimia 4 (1) : 54-62.
- Patrick, L. 2006. Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Alternative Medicine Review*. 11(2) : 114-127.
- Pratama, A. Y. 2016. *Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Riau Terhadap Kadar MDA dan Kadar ALP Pada Serum Hewan Model Tikus Yang Diinduksi CCl₄ [Skripsi]*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Malang
- Samuelson, D. A. 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. China: Saunders Elsevier.
- Shih, B.L., Yu, B. and Msu, J.C. 2005. The development of gastrointestinal tract and pancreartic enzymes in white roman geese. *Journal Animal Science* 18 : 841-847.

- Shofia, V., Aulanni'am, dan C. Mahdi. 2013. Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum prismaticum*) terhadap Kadar Malondialdehid dan Gambaran Histologi Jaringan Ginjal pada Tikus (*Rattus novvergicus*) Diabetes Melitus Tipe I. *Kimia Student Journal*. 1(1) : 119-125.
- Sholichah, N. A., Aulanni'am dan C. Mahdi. 2012. *Efek Terapi Ekstrak Air Daun Kedondong (Lannea coromandelica) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Protease pada Ileum Tikus Putih (Rattus novvergicus) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Akibat Paparan Indometasin*. *Veterinarian medika*. 5(3) : 187-194.
- Sirosis, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine : Principles and Procedures*. Elsevier. United Stated of America
- Specian RD and Oliver MG. 1991. *Fuctional biology of intestinal goblet cells*. *Am J Physiol*. 1991;260:C183-C193.
- Suckow, M. A., S.H. Weisbroth and C.I., Franklin. 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier Academic Press. USA
- Sunil, K and K. Dinesh. 2009. Antioxidant dan free radical scaveningung activities of edible weeds. *Affand Online* 9 : 1-17.
- Suprijono, A. Chodidjah, dan S. Banun. 2011. *Pengaruh Pemberian Timbal (Pb) Per Oral Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar*. *Jurnal Majalah Ilmiah Sultan Agung*. Volume 49 Nomor 123. Semarang.
- Suranto. 2007. *Terapi Madu*. Penebar Plus. Jakarta
- Suryohudoyo, p. 2000. Oksidan, Antioksidan dan Radikal bebas. *Dalam: Ilmu Kedokteran Molekuler*. Kapita Seleкта. Sagung Seto. Jakarta. H 31-46.
- Susi, D., Rimbawan., Faisal., Winarto dan Adi. 2012. *Efek Bubuk Tempe Instan Terhadap Kadar Malonaldehid (MDA) Serum Tikus Hiperglikemik*. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 6(2) : 72-74.
- Wahyuningsih, Cicilia Tyasti. 1008. *Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ketela Pohon (Manihot utilisima Pohl.) setelah Pemberian Na2CaEDTA terhadap Kadar Timbal Darah Tikus dengan Metode Spektroskopi Serapan Atom*. Universitas Sanata Dharma [Skripsi].
- Wati, I. P., Aulanni'am, dan C. Mahdi. 2013. *Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (Rattus novvergicus) Pasca Induksi Cyclosporine*. *A. Kimia Student Journal*. 1(2) : 258.
- Widjaya, C.H. 2003. Peran Antioksidan terhadap Kesehatan Tubuh. *Healthy Choice*, Edisi IV.
- Winarsi, H. 2010. *Protein Kedelai dan Kecambah, Manfaatnya bagi Kesehatan*, Cetakan I. Kanisius. Yogyakarta. 170-171.

- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta
- Xenoulis, P. G and J. M. Steiner. 2010. *Lipid Metabolism and Hyperlipidemia in Dog*. The Veterinary Journal. 183 : 12-21.
- Yamato, M., Y., kataoka, H. Mizuma, Y. Wada, and Y. Watanabe. 2009. PET and Macro and Microautoradiographic Studies Combined with Immunohistochemistry for Monitoring Rat Intestinal Ulceration and Healing processes. *The journal of nuclear medicine* 50 (2) : 226.
- Yoga, A. P. 2012. *Gambaran Histopatologi dan Jumlah Mikroflora Jejunum Tikus Putih (Rattus novergicus) yang Terpapar Indometasin dan Mendapat Suplementasi Bakteri Asam Laktat (BAL)* [skripsi]. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Zulhawa, Diniati Juliana. 2010. *Daya Hambat Madu Sumbawa terhadap Pertumbuhan Kuman Staphylococcus aureus Isolat Infeksi Luka Operasi RS Islam Amal Sehat Sragen* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Surakarta.

